



## CERTIFICATION OF TRANSLATION

I, Masaki Tanji, a citizen of Japan, of A-603, 6-1, Ichiban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0082 Japan, being competent in the Japanese and English languages, herewith certify that to the best of my knowledge and belief the attached English translation is a true and faithful translation made by me of Japanese Patent Application Laid-Open No. Hei 10-114675 published on May 6, 1998.

Date: November 25, 2005

Name: *Masaki Tanji*

Masaki Tanji

(19) Japan Patent Office (JP)

(12) Publication of Patent

Application (A)

(11) Patent Application Laid-Open

Hei 10-114675

(43) Date of Publication 5/6/1998

---

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	ID Codes	FI	
A61K 38/00	ADZ	A61K 37/02	ADZ
38/16		35/12	
//A61K 35/12		C07K 14/47	
C07K 14/47		14/79	
14/79		A61K 37/14	
Request for examination		Not yet requested	Number of claims 4 OL (Total 5 pages)

---

(21) Patent Application No. Hei 8-270247

(22) Date of Application 10/11/1996

Application has been filed under Patent Law, Art. 30(1).

Article "Abstracting journal No. 38 of Japanese Association for Oral Biology" was published on 8/31/1996 by the Editorial Board of Journal of Japanese Association for Oral Biology.

(71) Applicant: 000231109 Japan Energy Corporation, 2-10-1, Toranomon, Minato-ku, Tokyo

(72) Inventor: Yoshinori KUBOKI, 1-4-37, Nishino 8-jo, Nishi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido

(72) Inventor: Hourei OH, 1-7-7, Makami-cho, Takatsuki-shi, Osaka-fu

(74) Representative: Patent attorney, Yusuke HIRAKI (and two others)

---

(54) THERAPEUTIC AGENT FOR TREATING ENDOTOXIN-INDUCED DISEASES

(57) ABSTRACT

[Objective] To provide a pharmaceutical composition that can alleviate or mitigate endotoxin-induced diseases, such as septic shock or shock caused by Gram-negative bacteria.

[Means to achieve objective] A therapeutic agent for endotoxin-induced diseases containing human salivary histatin proteins, in particular histatin 5, as active ingredients.

[Claims]

[Claim 1] A therapeutic agent for endotoxin-induced disease containing human salivary histatin proteins as active ingredients.

[Claim 2] The therapeutic agent for endotoxin-induced disease according to claim 1, further containing lactoferrin as an additional active ingredient.

[Claim 3] The therapeutic agent for endotoxin-induced disease according to claim 1 or 2, wherein the endotoxin-induced disease is sepsis.

[Claim 4] The therapeutic agent for endotoxin-induced disease according to claim 1 or 2, wherein the human salivary histatin protein is histatin 5, histatin 6 or histatin 3.

[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

[0001]

[TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION] The present invention relates to a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of endotoxin-induced diseases, and more particularly, to a pharmaceutical composition to alleviate or mitigate septic shock or shock caused by Gram-negative bacteria.

[0002]

[PRIOR ART] Immunologically, it is well known that lipopolysaccharides (LPSs), endotoxins of Gram-negative bacteria, act as bacterial adjuvants that directly activate immune cells, it is also well known that LPSs are known to stimulate immune responses in a nonselective manner, and cause the activation of the alternative complement pathway. The biological activities of LPS are primarily associated with the lipid A region of LPS.

Due to nonselective stimulation of immune responses by LPS, the entry of endotoxins of many Gram-negative bacteria into the bloodstream induces systemic inflammatory response syndrome (SIRS) that leads to endotoxin shock and septic shock. The binding of endotoxins (LPS) to CD14 receptors on the cell membrane of cells such as macrophages has proven to be a key factor in the progress of the inflammatory responses (See, for example, J. Immunol., 150, 285-289 (1993)). LPS forms a complex with LPS-binding protein (LBP) to bind to CD14 receptors. It has been suggested that the binding induces production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (See, for example, T.R. Martin et al., J. Clin. Invest., 90, 2209-2219 (1992)). Other cytokines, such as IL-1, are also induced.

[0003] The use of neutralizing antibodies, such as HA-1A human monoclonal antibody, that selectively bind to the lipid A region of LPS has been proposed for the purpose of inhibiting activation of macrophages and induction of TNF- $\alpha$  production by endotoxins (LPS) (E.J. Ziegler et al., N. Engl. J. Med., 324, 429-436 (1991)). Also, attempts have been made to use partial peptide chains of LBP as a competitive inhibitor to inhibit the formation of LPS/LBP complexes (See, for example, WO 95/08560). Although these approaches that make use of, for example, neutralizing antibodies capable of binding to LPS in the reduction or prevention of the shock are expected to be

effective to some extent, these antibodies are associated with their own problems, such as the risk of allergies. Thus, there is a need for a pharmaceutical composition that uses an allergy-free human protein or peptide capable of binding to LPS and can be used in the prevention or treatment of endotoxin (LPS)-induced diseases.

[0004] Histatins, a family of histidine-rich salivary polypeptides secreted from parotid glands or other secretory glands, have been reported to have antimicrobial activity against certain bacteria (*e.g.*, *Streptococcus mutans*) and fungi (*e.g.*, *Candida albicans*) and play an important role in the non-immunological defense mechanisms in oral cavity (See, for example, F.G. Oppenheim et al., *J. Biol. Chem.*, 263, 7472-7477 (1988)).

Such antimicrobial activity of histatin is attributed to growth inhibition or microbicidal activity of histatin and is believed to involve binding of histatin to the outer membrane of microorganisms. Histatin has also proven to show an LPS-binding activity comparable to polymyxin B, a known antibiotic against Gram-negative bacteria.

While the antimicrobial activity of histatin has led to its application in the prevention of oral infection, histatin has never been applied to the treatment of septic shock or shock caused by Gram-negative bacteria for alleviating or mitigating the symptoms.

[0005]

#### [PROBLEMS TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

In view of the above-described problems, it is an object of the present invention to provide a pharmaceutical composition that can alleviate or mitigate endotoxin (LPS)-induced diseases, such as septic shock or shock caused by Gram-negative bacteria. Specifically, the pharmaceutical composition of the present invention contains human protein as an active ingredient.

[0006]

#### [MEANS TO ACHIEVE THE OBJECTIVE]

The present inventors have studied physiological activities, in particular antibacterial and antifungal activities, of various soluble proteins isolated from human saliva and have demonstrated that human salivary histatin proteins have strong binding activity to endotoxins (LPS) of Gram-negative bacteria (K. Sugiyama, *Experientia*, 49, 1095-1097 (1993)). The present inventors have also discovered that the ability of human salivary histatin proteins to bind to LPS is associated with the inhibitory effect of histatin on LPS binding to different types of cells and, thus, histatin is highly effective in alleviating or mitigating endotoxin (LPS)-induced diseases, such as septic shock or shock caused by Gram-negative bacteria. It is these discoveries that led to the present invention.

[0007] Thus, the present invention concerns a pharmaceutical composition that contains human salivary histatin proteins as active ingredients. Specifically, the

invention concerns a therapeutic agent for endotoxin-induced diseases that contains human salivary histatin proteins as active ingredients. The pharmaceutical composition of the present invention may further contain lactoferrin as an additional active ingredient. In such a case, the pharmaceutical composition contains an effective amount of human salivary histatin protein, along with a predetermined amount of lactoferrin that provides synergistic effect. The pharmaceutical composition of the present invention is effective against various endotoxin-induced diseases, in particular, sepsis. Preferably, the histatin for use in the pharmaceutical composition of the present invention is histatin 5, histatin 6 or histatin 3.

[0008]

#### [EMBODIMENT OF THE INVENTION]

Human salivary histatin proteins, the primary active ingredients in the pharmaceutical composition of the present invention, are a group of histidine-rich polypeptides found in human saliva. Isolation/purification techniques of histatin are well-established and the primary structure of histatin has been determined. At least twelve different histatins have been identified thus far. Histatins are divided into two subgroups: one group consists of histatins 1 and 2 and the other group consists of histatins 3 through 12 (See, for example, R.F. Troxler et al., J. Dent. Res., 69(1), 2-6 (1990)). Histatin 2 is considered to result from partial digestion of histatin 1 by peptidase. Histatins 4 through 12 are considered to be fragments of histatin 3.

[0009] Of these different histatins, histatin 5 is a peptide chain having the following amino acid sequence (I) (SEQ ID NO: 1). Histatin 5 is one of the most abundant species in saliva (See, for example, F.G. Oppenheim, et al., J. Biol. Chem., 263, 7472-7477 (1988)).

Amino acid sequence (I) (SEQ ID NO: 1)

[0010]

[Chemical formula 1]

Asp	Ser	His	Ala	Lys	Arg	His	His	Gly	Tyr	Lys	Arg	Lys	Phe	His
1				5				10					15	
Glu	Lys	His	His	Ser	His	Arg	Gly	Tyr						
				20			24							

[0011] The technique for isolating histatin 5 from saliva samples is described in a published article (Kawasaki, Kuboki et al., Eur. J. Biochem., 159, 249 (1986)). The abilities of histatins to bind to endotoxins (LPS) have been demonstrated by several experiments as described in a published article (K. Sugiyama, Experientia, 49, 1095-1097 (1993)): In Limulus test, 5ng/ml or more of histatin 5 added per 0.1ng/ml of LPS completely inhibited gelation; In RBC lysis test, 90% of the anticomplement

activity of LPS was inhibited when 1.5 $\mu$ g of histatin 5 was added per 0.1 $\mu$ g lipid A of LPS; and in two-dimensional diffusion test to determine the binding activity of histatin to LPS, 15 $\mu$ g of histatin 5 formed an amount of a precipitation of complex molecules comparable to 20 $\mu$ g of polymixin B, a compound known to bind to the lipid A region of LPS. It was also proven that histatin 5 exhibited substantially the same level inhibition of the anticomplement activity of LPS as polymixin B.

[0012] Histatin 1, which is assigned, based on its amino acid sequence homology, to the other of the two groups that does not include histatin 5 or histatin 3, also has the binding activity to LPS, though the activity is rather weak. Histatin 1 differs from histatin 5 not only in its amino acid sequence, but in that its second amino acid residue is a phosphorylated serine. Thus, aside from the difference in the amino acid sequence, the presence of the phosphorylated serine residue may contribute to the difference in their activity. It is likely that the phosphorylated serine residue plays a role in the binding of histatin 1 to lipid A of LPS, or other regions with phosphorylated backbones. Therefore, histatine 1, if dephosphorylated, may exhibit different binding activity than that of naturally-occurring histatin 1.

[0013] While the histatin for use in the pharmaceutical composition of the present invention is most preferably histatin 5, histatin 3 and histatin 6, each of which contains the amino acid sequence of histatin 5, can also produce favorable results. In other words, histatin 3 and histatin 6, each incorporating the amino acid sequence of histatin 5, can bind to LPS as effectively as histatin 5. Similar to histatin 6, other histatins that contain the amino acid sequence of histatin 5 but lack part of the amino acid sequence of histatin 3 are expected to show similar binding activity.

[0014] Lactoferrin (lactotransferrin) is an iron-binding glycoprotein found in milk of several mammalian species. Lactoferrin differs from transferrin, a  $\beta$ 1-iron-binding globulin present in human serum, in its chemical and immunological properties and possibly in the amino acid sequence of the peptide domains. Functionally, lactoferrin is believed to be involved in the transportation of iron to red blood cells, while serum transferrin serves to bind and transport blood iron to regenerative tissues such as bone marrow and liver.

[0015] A human protein, histatin exhibits no toxicity. During repeated administration, histatin does not induce antibody production or other immune responses caused by undesired antigenicity. Likewise, lactoferrin, a protein present in commonly consumed milk, exhibits no undesired antigenicity.

[0016] As demonstrated in Examples that follow, lactoferrin significantly enhances the ability of histatin to alleviate or mitigate endotoxin (LPS)-induced diseases, such as

septic shock or shock caused by Gram-negative bacteria. In this case, small doses of lactoferrin are effective enough: Preferably, lactoferrin is administered at a dose that produces little or no effect when lactoferrin is used alone but significantly enhances the therapeutic effect of histatin when lactoferrin is used in conjunction with histatin.

[0017] Histatin, including histatin 5, and lactoferrin for use as active ingredients in the pharmaceutical composition of the present invention are each a highly water-soluble protein and can be readily used in injections and other liquid preparations for intravenous administration. In general, these active ingredients are administered intravascularly through intravenous injection or infusion since endotoxin-induced diseases are associated with systemic immune responses. The pharmaceutical composition of the present invention is typically administered intravascularly once to several times a day, each at a dose corresponding to 0.2 to 10.0 $\mu$ M blood histatin level, while the dosage may vary depending on the age, sex and body weight of patients. As previously described, lactoferrin for use with histatin is administered at doses that can provide synergistic effect. Preferably, a single dose of lactoferrin corresponding to 5 to 50 $\mu$ g/ml blood lactoferrin level is delivered with a single dose of histatin corresponding to 0.2 to 3.0 $\mu$ M blood histatin level.

[0018] It is believed that the pharmaceutical composition of the present invention prevents the onset of endotoxin-induced diseases by suppressing the formation of LPS/LBP complex that significantly reduces the threshold for TNF- $\alpha$  production in macrophages stimulated by endotoxin (LPS). Specifically, histatin, in particular histatin 5, binds to the lipid A region of LPS quickly and selectively, thereby competitively inhibiting the formation of LPS/LBP complex. As a result, the binding of LPS/LBP complex to CD14 receptors on the cell membrane of macrophages is decreased. The LPS/histatin complex has a significantly reduced ability to bind to CD14 and other receptors on the cell membrane of macrophages, so that the production of TNF- $\alpha$  and other inflammatory humoral factors is not triggered. It is thought that this mechanism prevents excessive immune responses and subsequent shocks.

[0019]

[Examples] The present invention will now be described in further detail with reference to examples, which are intended to in no way limit the scope of the invention.

[0020]

(Example 1) The life-extending effect of histatin 5 on the lethal toxicity of LPS was examined in a mouse sepsis model. In this experiment, 1 to 10 $\mu$ g/body of LPS is administered to *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)-primed mice to induce endotoxin shock (See, for example, MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW, 1995 JUL 40(4) 42-45).

This experimental model is an endotoxin shock model commonly used. In this system, stimulation with *P. acnes* induces Th1 cells to produce TNF- $\gamma$ , which activates macrophages. The activated macrophages with the acquired response to LPS produce excessive amounts of TNF- $\alpha$ , IL-1 and other factors when exposed to small amounts of LPS. This excessive production of TNF- $\alpha$  and IL-1 induces shock.

[0021] Histatin 5 was administered to the above-described endotoxin shock model animals 2 hours prior to administration of LPS. This group was compared to a control group (no histatin) for the survival rate 24 hours after administration of LPS. In this test, 100 $\mu$ l/body of human saliva was used as a test sample containing histatin 5 and was intravascularly administered. Upon administration of LPS, 30mg/kg galactosamine was intravascularly administered with 1 $\mu$ g/body of LPS to slow metabolism of histatin 5 in the liver. 4 out of 5 animals survived in the group administered histatin 5 as compared to none in the control group.

[0022] The results indicate that histatin 5 has an ability to reduce serious shock induced by administration of LPS in animals in which macrophages have been activated and acquired response to LPS.

[0023]

(Example 2)

To determine if lactoferrin enhances the ability of histatin 5 to inhibit binding of LPS to macrophages, inhibition of LPS binding to fibroblasts was evaluated by using histatin or lactoferrin alone or histatin combined with lactoferrin. LPS is considered to bind to fibroblasts via a similar mechanism by which it binds to macrophages.

[0024]

Inhibition of binding of fluorescein-isothiocyanate (FITC)-LPS to gingival fibroblasts was determined by measuring the decrease in the amount of FITC-LPS observed when histatin 5 or lactoferrin was added. The obtained results were used to determine the inhibition rate. The inhibitory activity obtained when lactoferrin was used alone was shown in Table 1 and the inhibitory activity obtained when histatin 5 was used alone was shown in Table 2.

[0025]

[Table 1]

Lactoferrin ( $\mu$ g/ml)	Inhibition (%)
5	10
50	50
250	70
400	>95



[0026]

[Table 2]

Histatin 5 ( $\mu$ M)	Inhibition (%)
0.05	8
0.1	9
0.2	30
0.4	37
0.8	32
1.6	33
3.125	42
6.25	49

[0027]

The results indicate that histatin 5 and lactoferrin both have an ability to inhibit binding of LPS to gingival fibroblasts. Next, we determined if lactoferrin significantly enhances the inhibitory activity of histatin 5. Specifically, lactoferrin was added in an amount that showed a low inhibition rate when used alone (*i.e.*, 5 $\mu$ g/ml in Table 1), and the dependence of the inhibition rate of LPS binding to gingival fibroblasts on the amount of histatin 5 was determined. The results obtained in the presence and absence of lactoferrin are shown in Table 3.

[0028]

[Table 3]

Histatin 5 ( $\mu$ M)	Inhibition (%)	
	Lactoferrin (-)	Lactoferrin (+)
0.05	8	39
0.1	9	47
0.2	30	44
0.4	37	43
0.8	32	43
1.6	33	63
3.125	42	53
6.25	49	45

[0029] As shown in Table 3, the addition of 5 $\mu$ g/ml lactoferrin significantly enhanced the inhibition rate. The inhibition rate was highest at 1.6 $\mu$ M histatin 5. The results suggest that the addition of small amounts of lactoferrin significantly increases the inhibitory activity of histatin 5 when the amount of histatin 5 is 3 $\mu$ M or less. A synergistic increase in the inhibitory activity was observed in this range.

[0030] While the underlying mechanism for the enhancement of the inhibitory activity of histatin 5 by lactoferrin is still unknown, the above-described results may be suggesting that lactoferrin interacts with and binds to LPS through a different mechanism than the mechanism by which histatin 5 binds to the lipid A region of LPS and through this process, lactoferrin acts as a catalyst to facilitate binding of histatin 5 to LPS.

[0031]

[ADVANTAGE OF THE INVENTION] As set forth, the pharmaceutical composition of the present invention contains histatins, in particular, histatin 5, as an active ingredient, and inhibits formation of LPS/LBP complex that significantly reduces the threshold for TNF- $\alpha$  production in macrophages stimulated by endotoxin (LPS). The pharmaceutical composition can thus effectively suppress the production of TNF- $\alpha$  or other inflammatory humoral factors. Therefore, the pharmaceutical composition of the present invention can be used to alleviate or mitigate a wide range of LPS-induced diseases caused by endotoxin of different bacterial origins, such as septic shock or shock caused by Gram-negative bacteria.

[0032]

[Sequence Listing]

SEQ ID NO: 1

Length = 24

Type of sequence = amino acid

Topology = straight-chain

Kind of sequence = protein

Sequence

Asp	Ser	His	Ala	Lys	Arg	His	His	Gly	Tyr	Lys	Arg	Lys	Phe	His
1				5				10					15	
Glu	Lys	His	His	Ser	His	Arg	Gly	Tyr						
				20				24						

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A )

(11) 特許出願公開番号

特開平10-114675

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月6日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>		識別記号	F I
A61K 38/00		ADZ	A61K 37/02
38/16			35/12
// A61K 35/12			C07K 14/47
C07K 14/47			14/79
14/79			A61K 37/14
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)			

(21) 出願番号	特願平8-270247	(71) 出願人	000231109
(22) 出願日	平成 8 年(1996) 10月11日		株式会社ジャパンエナジー
特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成 8 年 8 月31日 歯科基礎医学会雑誌編集委員会発行の「歯科基礎医学会 雑誌第38巻抄録集」に発表			東京都港区虎ノ門二丁目10番 1 号
		(72) 発明者	久保木 芳徳
			北海道札幌市西区西野 8 条 1 丁目 4 番地37 号
		(72) 発明者	王 宝禮
			大阪府高槻市真上町 1 丁目 7 番地 7 号
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)

(54) 【発明の名称】 エンドトキシン誘発性疾患治療薬

(57) 【要約】

【課題】 エンドトキシン誘起性疾患、例えば、敗血症  
或いはグラム陰性菌症のショック症状を緩和軽減する効  
果を持つ医薬組成物の提供。

【解決手段】 ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類、特  
に、ヒスタチン 5 を有効成分とするエンドトキシン誘発  
性疾患治療薬。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類を有効成分として含有するエンドトキシン誘発性疾患治療薬。

【請求項 2】 更に、ラクトフェリンを有効成分として含有する請求項 1 記載のエンドトキシン誘発性疾患治療薬。

【請求項 3】 エンドトキシン誘発性疾患が敗血症である請求項 1 又は 2 記載のエンドトキシン誘発性疾患治療薬。

【請求項 4】 ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類がヒスタチン 5、ヒスタチン 6 又はヒスタチン 3 である請求項 1 又は 2 記載のエンドトキシン誘発性疾患治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンドトキシン誘発性疾患の抑制、治療目的に使用できる医薬組成物、特に、エンドトキシン(endotoxin) により誘発される疾患のうち、敗血症或いはグラム陰性菌症のショック症状の緩和軽減を目的とした治療に利用できる医薬組成物に関する。

## 【 0 0 0 2 】

【従来の技術】リポ多糖 (LPS: lipopolysaccharide)、具体的にはグラム陰性菌のエンドトキシンは、免疫学的には、直接免疫系細胞を活性化する菌体成分型アジュバントとして作用し、免疫反応を非選択的に促進するとともに、補体第二経路の活性化を果たすことがよく知られており、これら LPS の生物活性は、主にリポド A と称される部分によることが報告されている。この免疫反応の非選択的な促進活性に起因して、種々のグラム陰性菌のエンドトキシンが血液中に混入すると、エンドトキシンショック、敗血症性ショックにいたる全身性炎症反応症候群 (SIRS) が誘発される。その炎症反応が進行する過程において、エンドトキシン (LPS) とマクロファージ等の細胞膜上に存在する受容体 CD 1 4 との結合が重要であると報告されている (J. Immunol., 150, 285-289 (1993) 等)。この際、LPS とリポ多糖体結合蛋白質 (LBP: LPS-binding protein) の複合体が前記の受容体 CD 1 4 との結合に与り、それに伴い TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 産生を誘導することが示唆されている (T.R. Martin et al., J. Clin. Invest., 90, 2209-2219 (1992) 等)。同時に、その他のサイトカイン類、例えば、IL-1 等の産生が促進される。

【 0 0 0 3 】 LPS のリポド A 領域に選択的に結合する HA-1 A ヒトモノクローナル抗体等の中和抗体が、エンドトキシン (LPS) によるマクロファージ活性化、TNF- $\alpha$  産生誘発を阻害する目的での応用が提案されている (E.J. Ziegler et al., N. Engl. J. Med., 324, 429-436 (1991))。また、LBP の部分ペプチド鎖を用いて、LPS と LBP との複合体形成を競争的に阻害

する試み (WO 95/08560 等) もなされている。これら LPS との結合能を有する中和抗体等を利用するショック症状の軽減、予防法は、ある程度の効果は達成されるものの、例えば、中和抗体については、アレルギーを誘発する可能性を含む等新たな問題を内在するものである。このため、アレルギー誘発等の問題を含まないヒト由来の蛋白質、ペプチドであり、かつ LPS との結合能を有するものを用いて、エンドトキシン (LPS) により誘発される疾患の抑制、治療目的に使用できる医薬組成物の提供が望まれている。

【 0 0 0 4 】耳下腺等から分泌される唾液中に含まれ、ヒスタチンに富むポリペプチドであるヒスタチン類は、幾つかの細菌 (Streptococcus mutans)、真菌 (Candida albicans) に対して抗菌作用を示すこと、口腔内における非免疫的な防御機構に大きく関与するであろうことが報告されている (F.G. Oppenheim et al., J. Biol. Chem., 263, 7472-7477 (1988) 等)。加えて、前記の抗菌作用は、成長阻害或いは殺傷作用によるものであり、これら微生物の外部細胞膜上にヒスタチンが結合する過程があるであろうと推定されている。また、グラム陰性菌に対する抗生物質として知られているポリミキシン B と比較し得る程度の LPS に対する結合能を、ヒスタチンも示すことが報告されている。その殺菌作用を利用し、口腔内における感染の防止等の応用は提案されているが、敗血症或いはグラム陰性菌症のショック症状の緩和軽減を目的とした治療への適用は提案されていない。

## 【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記の課題を解決するものであり、本発明の目的は、エンドトキシン (LPS) により誘起される疾患、例えば、敗血症或いはグラム陰性菌症のショック症状を緩和軽減する効果を持つ医薬組成物、特に、ヒト由来蛋白質を有効成分として利用する医薬組成物を提供することにある。

## 【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒト唾液中より単離される種々の可溶性蛋白質の生理活性、特に、抗菌作用、抗真菌作用等の研究を進め、既に論文 (K. Sugiyama, Experientia, 49, 1095-1097 (1993)) に公表されているとおり、ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類がグラム陰性菌のエンドトキシン (LPS) と強い結合能を示すことを確認した。更に、この LPS に対する結合能に付随して、ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類が LPS の種々の細胞への結合を阻害する作用を有すること、加えて、エンドトキシン (LPS) により誘起される疾患、例えば、敗血症或いはグラム陰性菌症のショック症状の緩和軽減する効果に際だっていることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】即ち、本発明は、ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類を有効成分として含有する医薬組成物の発明であり、具体的には、ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類を

3

有効成分として含有するエンドトキシン誘発性疾患治療薬である。また、本発明の医薬組成物には、更に、ラクトフェリンを有効成分として含有せしめてもよく、この場合、ヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類の有効量に、相乗効果を発揮する量のラクトフェリンを添加することが好ましい。本発明の医薬組成物は、前記エンドトキシン誘発性疾患のうち、敗血症に適用すると好適である。なお、本発明の医薬組成物において利用されるヒスタチン類として、ヒスタチン5、ヒスタチン6又はヒスタチン3を用いることが好ましい。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の医薬組成物における有効成分であるヒト由来唾液蛋白質ヒスタチン類は、唾液中に存在するヒスタチンに富むポリペプチドであり、既にその単離精製法の確立及び一次構造の解明は行われ、少なくとも12種類のサブグループの存在が報告されて

Asp	Ser	His	Ala	Lys	Arg	His	His	Gly	Tyr	Lys	Arg	Lys	Phe	His
1				5					10				15	
Glu	Lys	His	His	Ser	His	Arg	Gly	Tyr						
				20				24						

【0011】なお、このヒスタチン5の唾液試料より分離方法は、公表された文献(Kawasaki, Kuboki et al., Eur. J. Biochem., 159, 249 (1986))に報告されている。ヒスタチン類のエンドトキシン(LPS)に対する結合能に関しては、既に論文(K. Sugiyama, Experientia, 49, 1095-1097 (1993))に報告されているとおり、例えば、リムルテストにおいて、LPS 0.1 ng/mlに対して、ヒスタチン5 5 ng/ml以上でゲル化を完全に阻止すること、LPSの示す抗補体活性の阻害に関しても、赤血球溶血反応により評価すると、LPSのリピドA 0.1 µgに対して、ヒスタチン5 1.5 µgで90%を越える阻害効果を示すこと、更には、LPSのリピドA領域と結合することが知られているポリミキシンBと対比させ、二次元拡散実験により、LPSに対する結合能を確認したところ、ヒスタチン5 15 µgとポリミキシンB 20 µgとで同等の複合体形成に伴う沈降が確認されている。また、ヒスタチン5とポリミキシンBのLPSの示す抗補体活性の阻害効果も同程度であることも確認された。

【0012】なお、アミノ酸配列の相同性の点から、ヒスタチン5或いはヒスタチン3とは異なるグループとされるヒスタチン1もその活性は劣るものの、LPSに対する結合能を示す。ヒスタチン1は、そのアミノ酸配列の違いのみでなく、第2番目のアミノ酸残基がリン酸化されたセリンである点でも、ヒスタチン5等と異なっている。アミノ酸配列の違いに加えて、このリン酸化されたセリンの存在が、活性の違いに関与するとも予測できる。特に、リピドAの如く、リン酸化を受けた骨格を含む領域との結合において、何らかの影響を与えることが想定される。従って、脱リン酸化されたヒスタチン1

4

いる。既に、報告されているとおり(R.F. Troxler et al., J. Dent. Res., 69(1), 2-6 (1990)等)、ヒスタチン類は、そのアミノ酸配列の相同性から、ヒスタチン1及び2、ヒスタチン3〜12は、それぞれグループをなしている。即ち、ヒスタチン2はヒスタチン1からペプチダーゼにより部分的な酵素消化を受けた断片と考えられ、ヒスタチン4〜12は、ヒスタチン3由来の断片と考えられる。

【0009】これら複数種のヒスタチン類のうち、ヒスタチン5は、下記のアミノ酸配列(I)(配列番号: 1)のペプチド鎖からなっており、唾液中の含有量の高いものの一種である(F.G. Oppenheim, et al., J. Biol. Chem., 263, 7472-7477 (1988)等)。

アミノ酸配列(I)(配列番号: 1)

【0010】

【化1】

は、天然のヒスタチン1と結合能の点で相違を生ずることも想定できる。

【0013】本発明の医薬組成物に利用できるヒスタチン類としては、ヒスタチン5が最も好ましいが、ヒスタチン5のアミノ酸配列を含むヒスタチン3及びヒスタチン6を用いても、ヒスタチン5と同様に好ましい結果が達成される。即ち、このヒスタチン3及びヒスタチン6は、LPSに対する結合においては、ヒスタチン5のアミノ酸配列を保持するので、全く遜色がない。また、ヒスタチン5のアミノ酸配列を保持する限り、ヒスタチン6の如く、ヒスタチン3に含まれるアミノ酸配列の一部を欠くものも、同様に利用することができる。

【0014】一方、ラクトフェリン(ラクトトランスフェリン)は、哺乳類の数種のミルクに見出される鉄結合性糖蛋白質であり、ヒト血清中に存在するβ<sub>1</sub>-鉄結合グロブリンであるトランスフェリンとは化学的、免疫学的性質が異なることが知られている。そのペプチド部分のアミノ酸配列が異なっているともされている。また、その役割の点でも、ラクトフェリンは、赤血球へ鉄分を輸送する過程に関与すると考えられているが、血清トランスフェリンは、血中の鉄と結合し、骨髄や肝臓の再生成組織へ運ぶ働きをするものとされている。

【0015】ヒスタチン類自体は、ヒト由来の蛋白質であるので、勿論毒性を示さず、連続的に投与を行うに際して、この蛋白質に対する抗体生成等の好ましくない抗原性に起因する免疫反応を引き起こすことはない。ラクトフェリンに関しても、通常経口的に摂取するミルクに含まれる蛋白質であるので、好ましくない抗原性を示すことはない。

【0016】下記の実施例に示すとおり、ラクトフェリ

ンを併用することにより、ヒスタチン類の有する、エンドトキシン(LPS)により誘起される疾患、例えば、敗血症或いはグラム陰性菌症のショック症状の緩和軽減する効果を格段に向上することが可能である。この際、併用するラクトフェリンの用量は、低い用量でよく、即ち、ラクトフェリン自体を投与する際には、効果が僅かであるが、ヒスタチン類を同時に用いることで相乗的に治療効果の格段の向上を果たす用量を用いるのが好ましい。

【0017】本発明の医薬組成物において、有効成分として利用されるヒスタチン5を初めとするヒスタチン類、並びにラクトフェリンは、いずれも水溶性に富む蛋白質であるため、両者とも容易に注射剤等、血管内投与に利用される液剤に調製することができる。エンドトキシン誘発性疾患は、全身性免疫反応に伴う疾患であるため、静脈注射、点滴等の血管内投与とされるのが通常である。本発明の医薬組成物の用量は、患者の年齢、性別、体重に応じて、また投与の目的、症状の軽重に従って異なるが、通常、ヒスタチン類として1回血中濃度0.2~10.0 $\mu$ Mに相当する量を1日1~数回血管内投与する。また、併用するラクトフェリンの用量は、前述するとおり、相乗効果を発揮する量とするのが好ましい。一般に、ヒスタチン類の用量1回血中濃度0.2~3.0 $\mu$ Mに相当する量に対して、ラクトフェリンの用量を1回血中濃度5~50 $\mu$ g/mlに相当する量の範囲等に選択することが好ましい。

【0018】本発明の医薬組成物のエンドトキシン誘発性疾患に対する発症の抑制緩和の作用は、エンドトキシン(LPS)の刺激によるマクロファージからのTNF- $\alpha$ 産生の閾値を著しく低下させるLPS/LBP複合体の形成を抑制することによると予測される。即ち、ヒスタチン類、特にヒスタチン5等は、LPSのリピドA領域と選択的かつ速やかに結合するので、前記のLPS/LBP複合体形成を競争的に阻害することができ、それに伴いLPS/LBP複合体がマクロファージ細胞膜上の受容体CD14に結合する過程を抑制できる。また、LPSとヒスタチン類の結合した複合体は、もはやマクロファージ細胞膜上の受容体CD14等に結合する能力が極度に劣るため、TNF- $\alpha$ 産生を始め、その他炎症性液性因子の産生が引き起こされない。このような機構により、過剰な免疫反応とそれに引き続き起こる種々のショック症状への進行が抑えられると考えられる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0020】(実施例1) マウス敗血症モデルを利用して、LPS致死毒性に対するヒスタチン5投与による延命効果を検証した。用いた系は、エンドトキシンショックモデルとしてよく知られている、Propionibacterium

acnes (P. acnes)を予め前投与しておき、LPS量1~10 $\mu$ g/bodyの投与でエンドトキシンショックを誘導する実験系である(MINOPHAGEN MEDICALREVIEW, 1995 JUL 4 0(4) 42-45等)。この系では、前投与したP. acnesの刺激によりTh1細胞が誘導を受け、このTh1細胞から産生されるTNF- $\gamma$ がマクロファージに作用して、活性化マクロファージが誘導されている。この活性化マクロファージはLPSに対する応答性を獲得しているため、少量のLPS投与に反応して、TNF- $\alpha$ 、IL-1等を過剰産生する。この過剰産生されたTNF- $\alpha$ 、IL-1等の作用で、ショック症状が誘発される。

【0021】前記のエンドトキシンショックモデルに対して、LPS投与の2時間前にヒスタチン5を投与し、LPS投与後24時間経過時における生存率を、ヒスタチン非投与(参照群)と比較した。なお、本試験では、ヒスタチン5を含む被験試料として、ヒト唾液100 $\mu$ l/bodyを血管内投与した。また、ヒスタチン5等の肝臓における代謝を遅らせる目的で、LPS投与の際、LPS1 $\mu$ g/bodyとガラクトサミン30 mg/kgを同時に血管内投与した。ヒスタチン5の投与群では、生存個体数は4/5であったが、非投与群では、生存個体数は0/5であった。

【0022】この結果より、ヒスタチン5は、予めLPSに対する応答性を獲得した活性化マクロファージが誘導されている系においても、LPS投与により誘起される重篤なショック症状を軽減緩和する効果を示すことが判る。

【0023】(実施例2) 前記するマクロファージへのLPS結合に対するヒスタチン5の阻害効果が、ラクトフェリンを並行して投与することを検証する目的で、類似する機構により、細胞上にLPS結合が起こると考えられる繊維芽細胞へのLPS結合に対する、ヒスタチン5とラクトフェリンの単独による阻害効果と、併用による格段の阻害効果の向上を検証した。

【0024】評価系は、歯肉繊維芽細胞へのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-LPSの結合に対するヒスタチン5とラクトフェリンの阻害活性を、フローサイトメトリーにより結合FITC-LPS量の減少を測定した。なお、測定結果を基に、阻害率として算定した。表1に、ラクトフェリンを単独で添加した際の阻害活性を、表2に、ヒスタチン5を単独で添加した際の阻害活性を示す。

【0025】

【表1】

ラクトフェリン添加量( $\mu$ g/ml)	阻害率(%)
5	10
50	50
250	70
400	>95

【0026】

【表 2】

ヒスタチン 5 添加量 ( $\mu$ M )	阻害率 ( % )
0. 0 5	8
0. 1	9
0. 2	3 0
0. 4	3 7
0. 8	3 2
1. 6	3 3
3. 1 2 5	4 2
6. 2 5	4 9

【 0 0 2 7 】 前記の結果に示されるとおり、ヒスタチン  
ヒスタチン 5 添加量 (  $\mu$  M )

0. 0 5  
0. 1  
0. 2  
0. 4  
0. 8  
1. 6  
3. 1 2 5  
6. 2 5

【 0 0 2 9 】 表 3 に示すとおり、ラクトフェリン 5  $\mu$ g/  
ml を併用することにより、阻害率は格段に向上してお  
り、特に最大の阻害率を示すヒスタチン 5 の添加量は、  
1. 6  $\mu$  M となっていることが判る。即ち、ヒスタチン 5  
の添加量が 3  $\mu$  M 以下の範囲で少量のラクトフェリンを  
併用することによる阻害活性の向上が著しい結果と解さ  
れる。この範囲においては、明らかに相乗的と認められ  
る阻害活性の向上が観測された。

【 0 0 3 0 】 この併用による阻害率の格段の向上の機構  
は判然とはしないが、ヒスタチン 5 は、L P S のリピド  
A の領域に作用するが、ラクトフェリンはヒスタチン 5  
とは異なる機構で L P S と相互作用、結合を行い、その  
違いに起因して、ヒスタチン 5 の L P S への結合を触媒  
的に促進する作用を果たしていることを示唆する結果と  
も考えられる。

【 0 0 3 1 】

【発明の効果】 本発明の医薬組成物は、ヒスタチン類、

配列

Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His  
1 5 10 15  
Glu Lys His His Ser His Arg Gly Tyr  
20 24

5 及びラクトフェリンともに、歯肉繊維芽細胞への L P  
S 結合に対する阻害活性を示すことが確認された。次い  
で、ラクトフェリンを併用することにより、ヒスタチン  
5 の阻害活性が格段に高まることを検証した。即ち、前  
記表 1 に示されるラクトフェリン単独では、阻害率が低  
いラクトフェリン添加量 5  $\mu$ g/ml を並行して添加した  
際、歯肉繊維芽細胞への L P S 結合に対する阻害率に対  
するヒスタチン 5 添加量依存性を測定した。表 3 に、ラ  
クトフェリン併用の有無による違いを対比して示す。

【 0 0 2 8 】

【表 3】

阻害率 ( % )

ラクトフェリン無 ラクトフェリン有

8 3 9  
9 4 7  
3 0 4 4  
3 7 4 3  
3 2 4 3  
3 3 6 3  
4 2 5 3  
4 9 4 5

特にヒスタチン 5 を有効成分として、エンドトキシン  
( L P S ) の刺激によるマクロファージからの T N F -  
 $\alpha$  産生の閾値を著しく低下させる L P S / L B P 複合体  
の形成を抑制することができ、T N F -  $\alpha$  産生を始め、  
その他炎症性液性因子の産生を有効に抑制する効果をも  
つ。従って、エンドトキシン ( L P S ) の由来する細菌  
の種類に依らず、かつ広範な L P S により誘起される疾  
患、例えば、敗血症或いはグラム陰性菌症のショック症  
状の緩和軽減する効果を発揮する。

【 0 0 3 2 】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 2 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質